

PXDN 表达水平对乳腺癌患者术后远期生存及预后的价值

宋霖¹ 张宁²

[摘要] **目的:**探讨乳腺癌组织过氧蛋白(PXDN)表达及其对预后的价值。**方法:**采用定量逆转录聚合酶链反应(qRT-PCR)和免疫组织化学染色检测 55 例乳腺癌组织和 30 例良性结节 PXDN 表达,Kaplan-Meier 法绘制不同 PXDN 表达乳腺癌患者总体生存和无瘤生存曲线,Cox 多因素回归模型分析乳腺癌预后的独立危险因素。**结果:**乳腺癌组织 PXDN mRNA 相对表达水平和 PXDN 染色评分明显高于良性结节组织,差异有统计学意义($P < 0.05$)。乳腺癌组织 PXDN 表达与年龄、肿瘤大小、TNM 分期、人表皮生长因子受体 2(Her-2)表达情况无关($P > 0.05$);PXDN 表达与淋巴结转移、雌激素受体(ER)阴性和孕激素受体(PR)阴性有关(均 $P < 0.05$)。PXDN 高表达组中位无瘤生存时间为 53 个月,PXDN 低表达组中位无瘤生存时间为 61 个月,差异有统计学意义($\chi^2 = 4.185, P = 0.041$)。PXDN 高表达组术后中位总体生存时间为 64 个月,PXDN 低表达组中位总体生存时间为 73 个月,差异有统计学意义($\chi^2 = 4.315, P = 0.038$)。ER、PR、Her-2 是影响乳腺癌无瘤生存的有意义风险因素(均 $P < 0.05$);ER、PR、Her-2 和 PXDN 表达是影响乳腺癌总体生存的有意义风险因素(均 $P < 0.05$)。**结论:**乳腺癌组织 PXDN 表达上调,PXDN 高表达是影响乳腺癌患者总体生存时间的独立危险因素。

[关键词] 乳腺癌;过氧蛋白;生存曲线;预后

doi:10.13201/j.issn.1004-2806-b.2018.10.011

[中图分类号] R737.9 **[文献标志码]** A

Expression of PXDN in patients with breast cancer and its clinical value for the prognosis

SONG Lin¹ ZHANG Ning²

(¹Department of Clinical Laboratory, Hubei Provincial People's Hospital, Wuhan, 430060, China; ²Department of Endocrinology, Hubei Provincial People's Hospital East Hospital)

Abstract Objective: To explore the expression of PXDN in breast cancer and its clinical value for the prognostic prediction. **Method:** Expression of PXDN in fifty-five breast cancer tissues and thirty benign nodule tissues were detected by using reverse transcription-polymerase chain reaction and immunohistochemical staining, respectively. The over-all survival and disease-free survival curve was drawn by Kaplan-Meier method in different PXDN expression group, independent prognostic factors were analyzed by Cox proportional hazards model. **Result:** The expression levels and ICH scores of PXDN were increased in the breast cancer tissues when compared to the benign nodule tissues, there was a significant difference between the two groups ($P < 0.05$). PXDN expression was closely correlated with lymph node metastasis, negative status of ER and PR ($P < 0.05$), but not with age, tumor size, TNM stage, Her-2 status ($P > 0.05$). The median disease-free survival time of the high PXDN group were 53 months, and 61 months in the low PXDN group, there was a significant difference between the two groups ($\chi^2 = 4.185, P = 0.041$). The median over-all survival time of the high PXDN group were 64 months, and 73 months in the low PXDN group, there was a significant difference between the two groups ($\chi^2 = 4.315, P = 0.038$). Cox multivariate regression analysis showed that ER, PR, Her-2 status was independently associated with disease-free survival of breast cancer, whereas ER, PR, Her-2 status and PXDN expression was independently associated with over-all survival of breast cancer (all $P < 0.05$). **Conclusion:** PXDN is upregulated in breast cancer. PXDN is an independent prognostic indicator of over-all survival time in patients with breast cancer.

Key words breast cancer; peroxidase; survival curve; prognosis

乳腺癌是世界范围内常见的恶性肿瘤,其发病率居女性恶性肿瘤的首位^[1]。近 10 年来,我国乳腺癌发病率逐年升高^[2],且发病呈年轻化趋势,目前 35 岁以下乳腺癌患者约占 15%。尽管目前对乳腺癌的综合治疗取得了很大的进步,但是复发和远

处转移依然是导致乳腺癌最终死亡的主要原因^[3]。因此寻找预后评估可靠的生化指标对乳腺癌的防治具有重要意义。过氧蛋白(peroxidase, PXDN)是一种过氧化物酶^[4],同时具有氧化特征和部分细胞外基质蛋白特性。PXDN 在多种上皮组织中低表达或不表达,而在上皮来源的恶性肿瘤中表达异常,提示 PXDN 有作为恶性肿瘤诊断和预后评估

¹湖北省人民医院检验科(武汉,430060)

²湖北省人民医院东院内分泌科

的潜在价值^[5]。但是目前尚未见关于 PXDN 与乳腺癌的相关报道。基于此,本研究采用免疫组织化学染色和定量逆转录聚合酶链反应(qRT-PCR)检测乳腺癌组织和癌旁组织 PXDN 表达,并进一步分析 PXDN 表达与乳腺癌患者临床资料的关系,旨在探讨 PXDN 对乳腺癌预后的预测价值。

1 资料与方法

1.1 样本采集与处理

收集 2012-04—2013-08 在我院肿瘤外科行手术治疗的 55 例女性浸润性乳腺癌样本,另收集 30 例同期在医院行微创手术的乳腺结节组织样本作为对照;所有组织样本采集后用 4% 多聚甲醛固定,石蜡包埋,制成厚度为 4 μm 的切片。乳腺癌患者纳入标准:术后经病理科检查确认病理类型,符合《乳腺癌病理组织学分类》^[6](2003 版)标准,患者临床资料完整。排除标准:术前行放疗、化疗或其他抗癌治疗,伴有其他恶性肿瘤者。

1.2 qRT-PCR 检测组织 PXDN mRNA 表达

采用 qRT-PCR 法检测组织 PXDN mRNA 表达,按照 TRIZOL(美国 Invitrogen 公司)试剂盒说明书提取总 RNA,利用逆转录试剂盒(日本 Takara 公司)反转录为 cDNA。一步法行定量 PCR,以 GAPDH 作为内参基因,PXDN 正义链为 5'-CAGGGACCTCGTTAATGGCT-3',反义链为 5'-CCGTTTCAGACAGCTGACGTT-3'。GAPDH 正义链为 5'-GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT-3',反义链为 5'-GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG-3'。反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 45 s,65 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 60 s,45 个循环。ABI 7900 统计软件分析结果,PXDN mRNA 相对表达水平采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法,以 PXDN/GAPDH 基因的比值作为 PXDN mRNA 相对表达量。

1.3 免疫组织化学染色检测

采用免疫组织化学染色法检测组织 PXDN 蛋白表达。取出样本组织,65 $^{\circ}\text{C}$ 加热烘烤 30 min,切片用梯度乙醇脱水,组织切片中加入山羊抗 PXDN 抗体(1:500,福州迈新生物技术开发有限公司),室温孵育 1.5 h;磷酸盐缓冲液冲洗 3 次,再加入辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG(武汉博士德生物工程公司),室温孵育 20 min,磷酸盐缓冲液冲洗 3 次。DAB 染液显色 15 min,苏木素轻度复染,显微镜下观察。以 PBS 代替一抗作为阴性对照组,高表达 PXDN 切片作为阳性对照。双盲评分法对染色进行评分,根据阳性细胞比例和染色强度采用半定量评分法对结果进行评价。染色强度:无染色代表 0 分,轻度染色代表 1 分,中度染色代表 2 分,重度染色代表 3 分。阳性细胞比例:无阳性细胞代表 0 分,阳性细胞比例 < 10% 代表 1 分,阳性细胞比例 10%~50% 代表 2 分,阳性细胞比例 > 50% 代

表 3 分。根据 Ero-Tolliver 等^[7]报道的 PXDN 免疫组化染色判定标准, ≤ 3 分为 PXDN 低表达, ≥ 4 分为 PXDN 高表达。

1.4 临床资料收集

收集乳腺癌患者临床资料包括患者年龄、肿瘤体积、肿瘤病理特征、TNM 分期、淋巴结转移数等。调查具有完整随访治疗的随访数据库,随访形式包括门诊随访和电话随访,随访截止日期为 2018 年 1 月 1 日;随访终点为末次随访或死亡日期或复发日期。

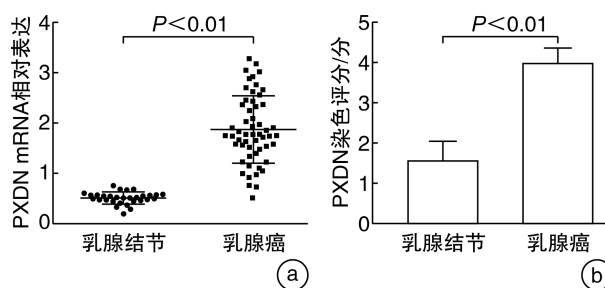
1.5 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件包进行数据处理,部分图形利用 GraphPad Prism 7.0 软件绘制,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,2 组间计量资料比较采用配对 t 检验;计数资料比较采用 χ^2 检验或 fishers 确切概率法。采用 Kaplan-Meier 法绘制乳腺癌患者生存曲线,Cox 回归模型进行多因素分析。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 乳腺癌组织和良性组织 PXDN 表达

乳腺癌组织 PXDN mRNA 相对表达水平明显高于乳腺良性结节组织,差异有统计学意义($P < 0.05$,图 1a)。乳腺癌组织 PXDN 染色评分明显高于乳腺良性结节组织,差异有统计学意义($P < 0.05$,图 1b)。PXDN 主要表达于乳腺癌细胞质,呈红棕色颗粒状(图 2)。

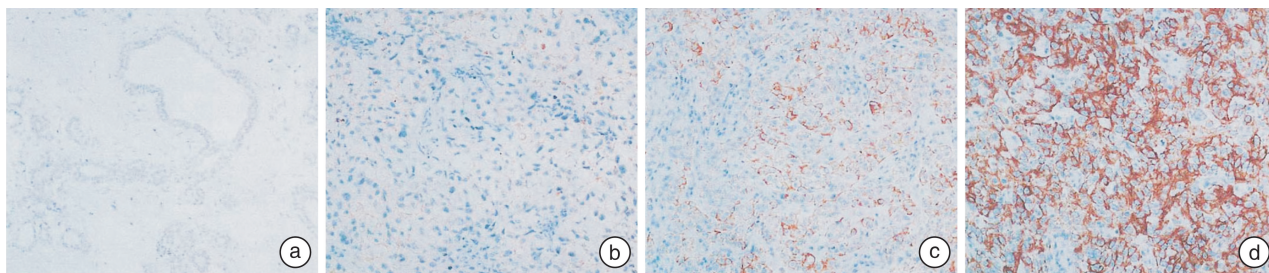


a: 乳腺结节和乳腺癌组织 PXDN mRNA 表达比较;b: 乳腺结节和乳腺癌组织 PXDN 染色评分比较。

图 1 乳腺癌组织和良性组织 PXDN 表达

2.2 乳腺癌组织 PXDN 表达与临床资料的关系

按照 PXDN 免疫组化染色判定标准,55 例乳腺癌患者分为 PXDN 低表达组 16 例和 PXDN 高表达组 39 例;乳腺癌组织 PXDN 表达与年龄、肿瘤大小、TNM 分期、人表皮生长因子受体 2(human epidermal growth factor receptor 2, Her-2)表达无关($P > 0.05$);PXDN 表达与淋巴结转移、雌激素受体(estrogen receptor, ER)阴性和孕激素受体(progesterone receptor, PR)阴性有关(均 $P < 0.05$),见表 1。



a: 乳腺结节组织 PDXN 阴性表达; b: 乳腺癌组织 PDXN 轻度染色; c: 乳腺癌组织 PDXN 中度染色; d: 乳腺癌组织 PDXN 重度染色。

图 2 乳腺癌组织和良性组织 PDXN 染色结果(ICH, ×100)

表 1 乳腺癌组织 PDXN 表达与临床资料的关系 例

临床参数	例数	PDXN		χ^2	P
		低表达 (n=16)	高表达 (n=39)		
年龄/岁				0.940	0.332
≤55	22	8	14		
>55	33	8	25		
肿瘤直径/cm				3.265	0.071
≤3	24	10	14		
>3	31	6	25		
淋巴结转移				6.297	0.012
阴性	43	16	27		
阳性	12	0	12		
TNM 分期				2.483	0.115
I + II	40	14	26		
III + IV	15	2	13		
ER				6.425	0.011
阴性	17	1	16		
阳性	38	15	23		
PR				7.110	0.008
阴性	22	2	20		
阳性	33	14	19		
Her-2				0.233	0.629
阴性	37	10	27		
阳性	18	6	12		

2.3 PDXN 表达与乳腺癌患者生存时间的关系

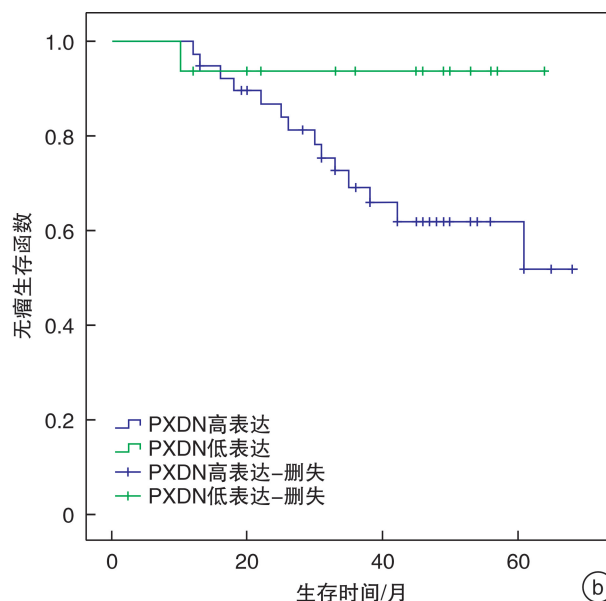
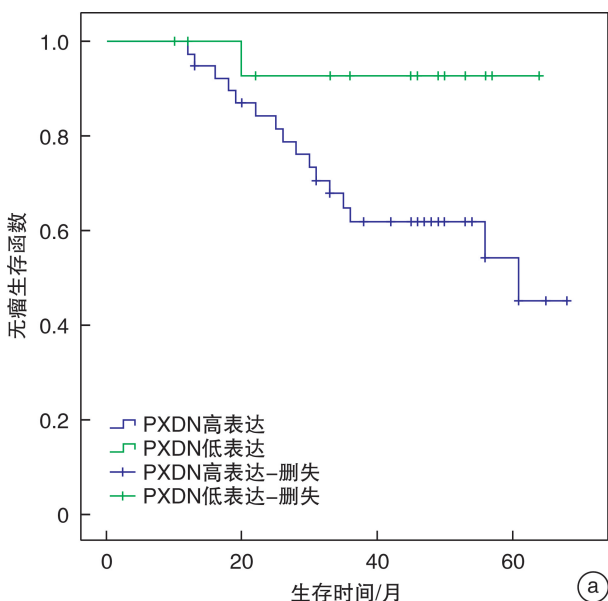
PDXN 高表达组中位无瘤生存时间为 53 个月, PDXN 低表达组中位无瘤生存时间为 61 个月, 差异有统计学意义($\chi^2 = 4.185, P = 0.041$, 图 3a)。PDXN 高表达组术后中位总体生存时间为 64 个月, PDXN 低表达组中位总体生存时间为 73 个月, 差异有统计学意义($\chi^2 = 4.315, P = 0.038$, 图 3b)。

2.4 乳腺癌预后 Cox 多因素分析

Cox 多因素回归分析显示, ER、PR、Her-2 是影响乳腺癌无瘤生存的有意义风险因素(均 $P < 0.05$); ER、PR、Her-2 和 PDXN 表达是影响乳腺癌总体生存的有意义风险因素(均 $P < 0.05$), 见表 2。

3 讨论

有研究显示^[7], PDXN 在多种上皮来源的恶性肿瘤细胞中异常表达, 并参与了肿瘤细胞的增殖、侵袭和转移等生物学过程。Jayachandran 等^[8]报道称转移性黑色素瘤组织 PDXN、NTN4 和 GLIS3 表达明显上调, 其中 PDXN 高表达与黑色素瘤细胞侵袭特性密切相关。Khan 等^[9]利用 GEO 和



a: PDXN 高表达和低表达乳腺癌患者无瘤生存曲线; b: PDXN 高表达和低表达乳腺癌患者总体生存曲线。

图 3 乳腺癌患者生存曲线

表 2 Cox 多因素分析乳腺癌患者预后影响因素

因素	无瘤生存			总体生存		
	HR	P	95%CI	HR	P	95%CI
年龄	0.135	0.171	0.016~1.215	0.453	0.364	0.082~2.531
肿瘤直径	1.084	0.881	0.364~3.223	1.953	0.153	0.774~1.889
淋巴结转移	1.077	0.543	0.848~1.367	1.140	0.775	0.458~2.919
TNM 分期	2.451	0.164	0.693~8.696	0.896	0.486	0.657~1.227
ER	1.568	0.001	1.195~2.058	1.283	0.002	1.092~2.509
PR	1.260	0.032	1.020~1.556	1.826	<0.001	1.589~2.098
Her-2	1.235	0.018	1.159~1.375	1.358	0.040	1.185~1.534
PXDN 表达	1.813	0.579	0.056~2.894	7.781	0.013	1.463~3.091

TCGA 数据库对卵巢癌组织 PXDN 表达进行分析,结果显示 PXDN 在卵巢癌组织也呈高表达,且与患者不良预后有关。Lázár 等^[10]研究称前列腺癌细胞中 PXDN 和 Snail1 高表达,PXDN 可能促进肿瘤细胞上皮-间叶样表型转化,进而参与肿瘤的侵袭转移。最新研究显示^[11],上皮来源的恶性肿瘤中 PXDN 表达异常,并且在不同类型肿瘤的表达差异较大。如 Holmila 等^[12]报道称肝细胞癌组织中 PXDN 表达上调,高表达 PXDN 与患者不良预后有关。Sitole 等^[13]则发现宫颈癌组织中 PXDN 表达下调。本研究首次对乳腺癌组织 PXDN 表达进行分析,结果显示乳腺癌组织 PXDN mRNA 相对表达水平和免疫组织化学染色评分均明显高于乳腺良性结节组织,说明 PXDN 在乳腺癌组织高表达,为其作为乳腺癌评估指标的可能提供了依据。

Wong 等^[14]研究显示 PXDN 的表达与肝细胞癌淋巴结转移、TNM 分期和组织学分级有关,PXDN 阳性表达的患者术后生存时间较阴性表达患者明显缩短。本研究进一步对 PXDN 与乳腺癌患者临床资料的相关性进行分析,结果显示乳腺癌组织 PXDN 表达与年龄、肿瘤大小、TNM 分期、Her-2 表达情况无关,但与淋巴结转移、ER 阴性和 PR 阴性有关。ER、PR 阴性乳腺癌细胞分化较差,属于非激素依赖性肿瘤,对内分泌治疗不敏感,患者预后较差。侵袭、转移是乳腺癌治疗失败、不良预后的主要原因。本研究结果显示 PXDN 与淋巴结转移、ER、PR 阴性等乳腺癌不良预后指标呈正相关,提示 PXDN 很可能与乳腺癌的不良预后有关。Soudi 等^[15]报道称 PXDN 与卵巢癌细胞的侵袭、转移有关,PXDN 介导的这种生物学行为可能是通过激活 PI3K/Akt 信号通路实现的。但是 PXDN 在乳腺癌中是否具有类似的作用机制仍需要进一步研究。

为了证实上述推测,本研究调查了肿瘤外科的随访数据库,结果显示 PXDN 高表达组总体生存时间和无瘤生存时间均明显低于 PXDN 低表达

组,说明 PXDN 高表达与乳腺癌患者较差生存预后有关。Yang 等^[16]采用 Kaplan-Meier 法对不同 PXDN 表达卵巢癌患者生存率对比观察,结果发现 PXDN 低表达患者 5 年生存率为 42.4%,明显高于 PXDN 高表达患者(20.5%),该研究进一步计算得出 PXDN 高表达是卵巢癌不良预后的危险因素之一。本研究采用 Cox 多因素回顾分析了影响乳腺癌生存时间的因素,结果显示 PXDN 表达是影响乳腺癌总体生存时间的危险因素,但不是无瘤生存时间的危险因素。有学者发现 PXDN 高表达同时属于肝癌无瘤生存和总体生存的独立危险因素^[17],与本研究结果存在差异,这可能与本研究样本量偏少,以及随访时间不长有关,需要大样本和多中心研究,以找出差异的原因。此外,本研究仅对 PXDN 表达和乳腺癌临床特征进行回顾性分析,其对乳腺癌细胞生物学行为的影响以及相关调控机制仍需要进行研究。

综上所述,乳腺癌组织 PXDN 表达上调,PXDN 高表达是影响乳腺癌患者总体生存时间的独立危险因素。

参考文献

- [1] Yip CH, Buccimazza I, Hartman M, et al. Improving Outcomes in Breast Cancer for Low and Middle Income Countries [J]. World J Surg, 2015, 39: 686 - 692.
- [2] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66: 115 - 132.
- [3] 任庆余, 杨星, 侯兰芬. PET/CT 诊断乳腺淋巴瘤 1 例并文献复习 [J]. 临床血液学杂志, 2015, 28(9): 803 - 805.
- [4] Péterfi Z, Tóth ZE, Kovács HA, et al. Peroxidase-like protein: A novel peroxidase homologue in the human heart [J]. Cardiovasc Res, 2014, 101: 393 - 399.
- [5] Gu SQ, Bakthavachalu B, Han J, et al. Identification of the human PMR1 mRNA endonuclease as an alternatively processed product of the gene for peroxidase-like protein [J]. RNA, 2012, 18: 1186 - 1196.
- [6] Sinn HP, Kreipe H. A Brief Overview of the WHO

- Classification of Breast Tumors, 4th Edition, Focusing on Issues and Updates from the 3rd Edition[J]. *Breast Care*(Basel), 2013, 8: 149–154.
- [7] Ero-Tolliver IA, Hudson BG, Bhave G. The Ancient Immunoglobulin Domains of Peroxidase Are Required to Form Sulfilimine Cross-links in Collagen IV[J]. *J Biol Chem*, 2015, 290: 21741–21748.
- [8] Jayachandran A, Prithviraj P, Lo PH, et al. Identifying and targeting determinants of melanoma cellular invasion[J]. *Oncotarget*, 2016, 7: 41186–41202.
- [9] Khan K, Rudkin A, Parry DA, et al. Homozygous mutations in PXDN cause congenital cataract, corneal opacity, and developmental glaucoma. [J]. *Am J Hum Genet*, 2011, 89: 464–473.
- [10] Lázár E, Péterfi Z, Sirokmány G, et al. Structure-function analysis of peroxidase provides insight into the mechanism of collagen IV crosslinking[J]. *Free Radic Biol Med*, 2015, 83: 273–282.
- [11] Gao H, Tao Y, He Q, et al. Functional enrichment analysis of three Alzheimer's disease genome-wide association studies identifies DAB1 as a novel candidate liability/protective gene [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 463: 490–495.
- [12] Holmila R, Sklias A, Muller DC, et al. Targeted deep sequencing of plasma circulating cell-free DNA reveals Vimentin and Fibulin 1 as potential epigenetic biomarkers for hepatocellular carcinoma [J]. *PLoS One*, 2017, 12: e0174265.
- [13] Sitole BN, Mavri-Damelin D. Peroxidase is regulated by the epithelial-mesenchymal transition master transcription factor Snai1[J]. *Gene*, 2018, 646: 195–202.
- [14] Wong JK, Campbell D, Ngo ND, et al. Genetic study of congenital bile-duct dilatation identifies de novo and inherited variants in functionally related genes [J]. *BMC Med Genomics*, 2016, 9: 75.
- [15] Souidi M, Paumann-Page M, Delporte C, et al. Multidomain human peroxidase 1 is a highly glycosylated and stable homotrimeric high spin ferric peroxidase [J]. *J Biol Chem*, 2015, 290: 10876–10890.
- [16] Yang X, Zhu S, Li L, et al. Identification of differentially expressed genes and signaling pathways in ovarian cancer by integrated bioinformatics analysis[J]. *Oncotargets Ther*, 2018, 11: 1457–1474.
- [17] Wang X, Zhang Q, Wang Y, et al. Clinical Significance of Ubiquitin Specific Protease 7 (USP7) in Predicting Prognosis of Hepatocellular Carcinoma and its Functional Mechanisms [J]. *Med Sci Monit*, 2018, 24: 1742–1750.

(收稿日期: 2018-06-22)

网上投稿注意事项

本刊采用远程投稿处理系统,请登录“<http://www.whuhzcs.com>”投稿。注册用户名上传文章后,投稿系统一旦收到稿件,即自动发送“收稿回执”并通知编号。作者可根据此编号网上查询稿件处理情况。凡寄给个人的稿件,本刊一律不予受理。凡通过 E-mail 投寄的稿件均不算正式投稿(编辑部通知除外)。投稿时请注明第一作者和通信作者有效的联系方式(手机、邮箱),以便联系。

投稿完毕后请作者将一份纸质稿件(注明稿件编号)和单位介绍信及论文授权书一并寄至本刊编辑部(武汉市解放大道 1277 号《临床血液学杂志》编辑部,430022)存档。作者中如有外籍作者或论文系作者在海外进修、学习、工作后撰写,还应附有国外所属工作单位同意在本刊发表的函件。

本刊再次强调:在审阅中的稿件,作者如欲改投他刊,请立刻与本刊联系说明原因,如发现一稿两投的情况,视为学术不端,我们将严肃处理,通报所有相关杂志和该作者单位,并予以披露。本刊一般不退原稿,请作者自留底稿。

如有疑问,请拨打编辑部电话咨询,电话:(027)85726342–8806。

《临床血液学杂志》编辑部